

In vitro-Untersuchungen zur Interaktion pharmazeutisch relevanter Tenside mit den humanen Effluxtransportern P-Glycoprotein und MRP2

Die orale Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen ist von entscheidender Bedeutung für den Erfolg einer Arzneimitteltherapie. Zu ihrem Ausmaß tragen unter anderem aktive Aufnahme- und Sekretionsprozesse erheblich bei. Der bekannteste aktive Auswärtstransport von Arzneistoffen ins Lumen sekretorischer Organe wie Darm oder Leber erfolgt über das ABC-Transportprotein P-Glycoprotein (P-gp). Daneben wird vor allem die Bedeutung des *Multidrug Resistance Associated Protein 2* (MRP2) als Determinante für die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zunehmend erkannt. Pharmazeutische Hilfsstoffe, die die Löslichkeit von Arzneistoffen verbessern sollen, stehen zunehmend in Verdacht, über eine Wechselwirkung mit diesen zellulären Transportern aktiv Einfluss auf die Bioverfügbarkeit zu nehmen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, strukturell unterschiedliche pharmazeutisch genutzte Tenside *in vitro* hinsichtlich ihrer Interaktionen mit den Effluxtransportern P-gp und MRP2 zu untersuchen. Zum Einsatz kamen dabei die nichtionischen Tenside Cremophor[®] EL, Cremophor[®] RH 40, Polysorbat 80, Vitamin E TPGS 1000, Pluronic[®] PE 10300 und der Saccharosefettsäureester L-1695. Diese Stoffe werden vorrangig als Solubilisatoren in parenteralen Zubereitungen oder, wie im Fall des Saccharosefettsäureesters, als Zusatzstoffe in der Lebensmitteltechnologie eingesetzt. Für die *In vitro*-Untersuchungen dienten die mit humanem P-gp und MRP2 transfizierten Hundenierenzellen MDCK-MDR1 und MDCK-MRP2. In einer vergleichenden Untersuchung mit den nativen Zellen wurde zunächst mittels Western Blot, Bestimmung der mRNA und Immunfluoreszenzmikroskopie die stabile und ausgeprägte Expression der Transporter in den Transfektanden nachgewiesen.

Für beide Transporter wurden zunächst verschiedene Zellassays mit bekannten P-gp- und MRP2-Inhibitoren etabliert. Der Einfluss der einzelnen Tenside auf P-gp wurde unter Verwendung eines Calcein-AM-Aufnahmeassays und eines Transportassays mit Rhodamin 123 untersucht. Mit beiden Assays konnten Interaktionen zwischen einzelnen Tensiden und P-gp ermittelt werden. Im Calcein-AM-Aufnahmeassay erwiesen sich besonders Pluronic[®] PE 10300 und der Saccharosefettsäureester L-1695 als potente Inhibitoren des PGlycoproteins. Diese beiden Tenside zeigten eine mit den bekannten P-gp-Hemmstoffen Ivermectin und Valspodar vergleichbare Hemmung. Eine moderate Inhibition konnte für Cremophor[®] EL, Polysorbat 80 und Vitamin E TPGS beobachtet werden. Cremophor[®] RH 40 zeigte dagegen keinen hemmenden Effekt auf P-gp.

Diese Ergebnisse konnten durch den Transportassay teilweise bestätigt werden. Lediglich der zuvor beobachtete ausgeprägte inhibitorische Charakter des Saccharosefettsäureesters L-1695 konnte durch den Transportassay nicht erhärtet werden. Ursache hierfür scheint jedoch die ausgeprägte Zytotoxizität des Saccharosefettsäureesters zu sein, welche bei den längeren Inkubationszeiten während des Transportassays stärker zum Tragen kommt.

Die Wechselwirkungen mit MRP2 wurden ebenfalls mithilfe eines Transportassays untersucht. Hierbei diente Calcein-AM als zellpermeable Vorstufe, welche intrazellulär durch unspezifische Esterasen in das MRP2-Substrat Calcein umgesetzt wird. Die Untersuchungen ergaben für Cremophor[®] EL eine ausgeprägte Hemmwirkung. Vitamin E TPGS 1000, Cremophor[®] RH 40 und Polysorbat 80 zeigten eine ähnliche, jedoch geringere inhibierende Wirkung auf MRP2. In höheren Konzentrationen wiesen diese vier Tenside alle eine vergleichbare oder stärker

inhibierende Wirkung als die Positivkontrolle (100 µM Probenecid) auf. Dagegen übten L-1695 und Pluronic® PE 10300 keinen hemmenden Effekt auf MRP2 aus. Die hier beobachtete Steigerung des Substrattransportes konnte auf eine ausgeprägte P-gp-Hemmung zurückgeführt werden, welche zu einer Anreicherung von Calcein im Zellinneren und somit zu einem gesteigerten Auswärtstransport des Substrates führte.

Nähere Untersuchungen zum Mechanismus des MRP2-Transportassays ergaben sowohl im ungehemmten als auch im gehemmten Zustand der Zellen eine von der Substratkonzentration unabhängige Permeabilität. Eine mit steigender Substratkonzentration proportionale Zunahme der Transportrate konnte jedoch nicht auf eine intrazelluläre Calceinakkumulation zurückgeführt werden. Dies lässt sich am ehesten durch die Einstellung eines dynamischen Gleichgewichtes zwischen Calcein-AM und Calcein in der Zelle erklären, welches durch zelluläre Esterasen reguliert wird.

Um den Mechanismus der beobachteten MRP2-Hemmung durch Cremophor® EL und RH 40 sowie Polysorbat 80 und Vitamin E TPGS näher zu untersuchen, wurde zum einen der Einfluss dieser Tenside auf den Glutathiontransport untersucht, da eine Vielzahl von MRP2-Substraten glutathionabhängig transportiert werden. Zum anderen wurde auch eine mögliche Beeinflussung der Gen- und Proteinexpression von MRP2 überprüft. Dabei ergab sich weder für den Glutathionhaushalt noch für die Expression der *MRP2*mRNA oder die Proteinexpression eine wesentliche Beeinflussung durch die Anwesenheit der Tenside.

Da in der Literatur gezeigt wurde, dass Polysorbat 80 im systemischen Kreislauf deutliche Instabilitäten zeigt, sollte in dieser Arbeit auch die Stabilität von Polysorbat 80 gegenüber intestinalen Enzymen überprüft werden. HPLC-MS-Untersuchungen mit Pankreatin zeigen einen deutlichen Abbau des Tensides, welcher zum Teil auf die esterassenvermittelte Abspaltung von Ölsäure aus dem Polysorbatmolekül zurückgeführt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit konnten Erkenntnisse über das Wechselspiel zwischen pharmazeutisch relevanten Tensiden und den Effluxtransportern P-gp und MRP2 vertieft werden. Da für die untersuchten Tenside mit beiden Transportern zum Teil deutliche Interaktionen beobachtet wurden, scheint eine wesentliche Anforderung an Hilfsstoffe, die pharmakologische Indifferenz, nicht mehr gegeben. Der Einsatz dieser Tenside als Hilfsstoffe im klassischen Sinn sollte somit neu überdacht werden. Die gezielte Verwendung dieser Hilfsstoffe in Kombination mit Arzneistoffen, deren Wirksamkeit durch aktive Sekretionsprozesse limitiert wird, bietet jedoch die Möglichkeit, deren Bioverfügbarkeit wesentlich zu verbessern.

Ulrike Adam, Juli 2007